

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 51/08

//(A61K103: 10,1

23: 00)

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95193737.5

[45] 授权公告日 2002 年 7 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1087955C

[22] 申请日 1995.5.1

[21] 申请号 95193737.5

[30] 优先权

[32] 1994.5.2 [33] US [31] 08/236,402

[86] 国际申请 PCT/US95/05340 1995.5.1

[87] 国际公布 WO95/29708 英 1995.11.9

[85] 进入国家阶段日期 1996.12.23

[73] 专利权人 迪亚太德公司

地址 美国新罕布什尔州

[72] 发明人 里查德·T·迪安

约翰·利斯特-詹姆斯

威廉·麦克布赖德

[56] 参考文献

WO 93/10747A 1993.6.10 A61K49/02

WO 93/23085A 1993.11.25 A61K49/02

审查员 刘菊芳

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 黄益芬

权利要求书 4 页 说明书 23 页 附图页数 4 页

[54] 发明名称 铟-99m 标记的成像剂

[57] 摘要

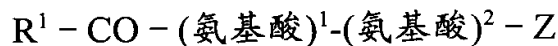
本发明涉及放射性标记的闪烁成像剂以及用于制备这种成像剂的试剂和用于生产和使用这种试剂的方法,本发明特别涉及制备哺乳动物体内部位成像的闪烁成像剂用的试剂,它含有以共价连接到一个结合放射性标记部分的一种特异性结合化合物,具体的是其特异性结合的肽,本发明提供这种试剂、生产这种试剂的方法和试剂盒、以及用铟-99m(T_c-99m)通过含有上述试剂的 T_c-99m 结合部分所标记的这种试剂的使用方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权利要求书

1、一种用于制备哺乳动物体内部位成像的闪烁成像剂的试剂，它含有一种分子量小于 10,000 道尔顿的特异性结合肽，此特异性结合肽共价连接到一种式 I 或式 II 的放射性标记复合部分上：

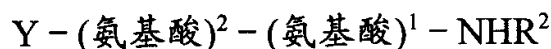
I



其中(氨基酸)¹和(氨基酸)²均为彼此独立的任何一种不含硫羟基的初级 α - 或 β - 氨基酸，Z 是含硫羟基的半胱氨酸、高半胱氨酸、异半胱氨酸、青霉胺、2-巯基乙胺或 3-巯基丙胺部分；R¹ 是低级(C₁ - C₄)烷基或一种与此特异性结合肽连接的共价键；

其中当 Z 为半胱氨酸、高半胱氨酸、异半胱氨酸或青霉胺时，所述部分的羰基共价连接到 NR³R⁴ 基、氨基酸或含有 2 至 10 个氨基酸的肽，其中 R³ 和 R⁴ 是彼此独立的 H 或低级(C₁ - C₄)烷基；或

II

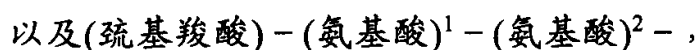


其中 Y 是一个含硫羟基的半胱氨酸、高半胱氨酸、异半胱氨酸、青霉胺；(氨基酸)¹和(氨基酸)²均为彼此独立的任何一种不含硫羟基的初级 α - 或 β - 氨基酸，而 R² 是 H 或低级(C₁ - C₄)烷基或一种与此特异性结合肽共价连接的键；

其中 Y 的氨基共价连接到一个氨基酸或一种含 2 至 10 个氨基酸的肽；以及

其中放射性标记复合部分通过 R¹、R²、(氨基酸)¹ 或(氨基酸)² 侧链上的一个侧链基、或者半胱氨酸、高半胱氨酸、异半胱氨酸或青霉胺的氨基或羧基，以共价键连接到此特异性结合肽上。

2、如权利要求 1 所述的试剂，其中放射性标记复合部分从以下通式中选择：



其中(氨基酸)¹和(氨基酸)²为彼此独立的任何一种初级 α - 或 β - 氨基酸；(氨基硫羟)选自半胱氨酸、异半胱氨酸、高半胱氨酸、青霉胺、2-巯基乙

胺和 3-巯基丙胺以及(巯基羧酸)选自半胱氨酸、异半胱氨酸、高半胱氨酸、青霉胺、2-巯基乙酸、和 3-巯基丙酸。

3、权利要求 2 的试剂，其中放射性标记复合部分从具有式 - Gly - Gly - Cys - 或 Cys - Gly - Gly - 的部分中选择。

- 5 4、权利要求 1 的试剂，其中特异性结合肽选自由以下序列组成的组：
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCK.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCR.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCRD.酰胺)
- 10 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCRK.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCRR.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCKK.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCKKK.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.Orn.酰胺)
- 15 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCKDK.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.Orn.D.Orn.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.Orn.D.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.KKC.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.KRC.酰胺)
- 20 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.RRC.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.KKCK.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GRCK.酰胺)
- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GKCR.酰胺)
- CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGC_{Ac}GC_{Ac}GGC.酰胺
- 25 CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGC_{Ac}GC_{Ac}GGCG.酰胺
- CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGSSGGCG.酰胺
- CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGCG.酰胺
- CH₂CO.Y_D.Amp.GDCKGCG.酰胺
- GRGDGGC
- 30 GLFCGC.酰胺
- GRGDGGGGC

F_DFYW_DKTFTGGC.酰胺

乙酰基.CGGY.[(CH₂)₄-吡啶]或

β-葡聚糖-(-NNHCO.(CH₂)₃CO.)GGC.酰胺。

5、权利要求1的试剂，其中特异性结合肽是一种含有4至100个氨基酸的特异性结合肽。

6、权利要求5的试剂，其中特异性结合肽和放射性标记复合部分通过一个或多个氨基酸共价键合。

7、权利要求1的试剂，其中特异性结合肽中包括线性或环状肽。

8、权利要求1的试剂，其中该试剂还包含一个多价键合部分，它共价键合到多个特异结合肽上，而且还共价键合到多个放射性标记复合部分上，以组成一种用于制备一种多聚体的多价闪烁成像剂的试剂，其中多聚体的多价闪烁成像剂的分子量大约小于20,000道尔顿。

9、权利要求8的试剂，其中多价键合部分为双-琥珀酰亚胺甲醚、4-(2,2-二甲基乙酰基)苯甲酸、三(琥珀酰亚氨基乙基)胺、4-(O-CH₂CO-Gly-Gly-Cys. 酰胺)苯乙酮，双-琥珀酰亚氨基己烷，三(2-氯乙酰氨基乙基)胺，以及1,2-双-[2-氯乙酰氨基)乙氧基]乙烷或它们的衍生物。

10、一种含有权利要求1-9中任一项的试剂的闪烁成像剂，其中放射性标记复合部分与一个放射性标记物结合。

11、权利要求10的试剂，其中放射性标记物为钷-99m。

12、一种复合物，由权利要求1-9中任一项所述的试剂与钷-99m在一种还原剂存在下反应生成。

13、权利要求12的复合物，其中还原剂从连二亚硫酸盐离子、亚锡离子和亚铁离子中选择。

14、一种用于制备一种放射性药物制剂的试剂盒，所述的试剂盒包括一个密封管形瓶，该管形瓶中含有一种预先确定剂量的权利要求1-9中任一项的试剂，以及一种用钷-99m标记此试剂的足量还原剂。

15、一种用于标记权利要求1-9中任一项的试剂的方法，包括在一种还原剂存在下使钷-99m与此试剂发生反应。

16、权利要求15的方法，其中还原剂从连二亚硫酸盐离子、亚锡离子和亚铁离子中选择。

17、权利要求2的试剂在制备用于哺乳动物体内部位成像的药物的应用，其中该药物含有诊断有效量的权利要求2的试剂。

18、一种具有下式的化合物：

- 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCK.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCR.酰胺)
 5 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCRD.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCRK.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCRR.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCKK.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCKKK.酰胺)
 10 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.Orn.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCKDK.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.Orn.D.Orn.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.Orn.D.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.KKC.酰胺)
 15 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.KRC.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.RRC.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.KKCK.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GRCK.酰胺)
 环(N-甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GKCR.酰胺)
 20 CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGC_{Acm}GC_{Acm}GGCG.酰胺
 CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGSSGGCG.酰胺
 CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGCG.酰胺
 CH₂CO.Y_D.Amp.GDCKGCG.酰胺
 GLFCGC.酰胺
 25 F_DFYW_DKTFTGGC.酰胺
 乙酰基.CGGY.[(CH₂)₄-哌啶]或
 β-葡聚糖-(-NNHCO.(CH₂)₃CO.)GGC.酰胺。

19、权利要求 1-9 中任一项的试剂在制备哺乳动物体内部位成象的闪烁成象剂中的应用，其中哺乳动物体内的成像部位是血栓部位或感染部位。

30 20、根据权利要求 18 的化合物，它是经钨-99 m 放射性标记的。

21、一种包含一个密封管形瓶的产品，此管形瓶中含有一种预定量的权利要求 18 的化合物以及一种用于钨-99 m 标记此组合物的足量还原剂。

说明书

铈 - 99 m 标记的成像剂

5

本发明背景

发明的技术领域

本发明涉及放射诊断试剂以及用于生产标记放射诊断剂的方法。特别涉及用于哺乳动物体内成像部位的闪烁成像剂，此闪烁成像剂含有用铈 - 99 m(Tc - 99 m)标记的特异性结合化合物，此标记是借助于一个与 Tc - 99 m 形成复合物的结合放射标记的部分来完成的。本发明提供放射性标记闪烁成像剂、用于制备上述放射性标记闪烁成像剂的试剂、标记上述试剂的方法、以及含有本发明的非放射性具体试剂和其它组分的试剂盒，此试剂盒用于制备本发明的闪烁成像剂。

现有技术的描述

15 医生能够用非侵害性手段确定病人病理状态的部位，这在临床上具有普遍的意义。这些病理状态包括：肺、心、肝、肾、骨和脑的疾病，以及癌、血栓形成、肺栓塞、感染、炎症和动脉粥样硬化。

在核医学领域，通过探测少量体内给药的放射性标记示踪化合物(称作放射性示踪物或放射性药物)的分布，确定病理状态的位置或测定其范围。探测 20 这些放射性药物的方法通常被称作成像方法或放射成像方法。

在放射成像中，放射标记是一种发射 γ - 射线的放射性核素，用一个 γ - 射线探测照相机确定该放射性示踪的位置(此方法通常被称作 γ 闪烁照相法)。因为可选择性地使放射性示踪物定位在病理部位(称作阳性对照)，或者也可不是定位在这样的病理部位(称作阴性对照)，所以成像位置是可探测 25 的。在许多情况下，用一种放射性标记的特异性结合化合物作为一种放射性药物具有特别的意义，此放射性药物具体确定体内的病理位置。

已知许多种放射性核素可用于放射性成像，包括： ^{67}Ga 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Tc - 99 m)、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{109}Yb 或 ^{186}Re 。要获得人体最理想的放射性成像必须考虑许多因素。为了最大限度地提高探测效果，优选一种放射性核素， 30 其发射出的 γ 射线能量在 100 - 200 KeV 范围内。为减少病人吸收的辐射量，放射性核素的物理半衰期应同成像过程所要求的一样短。为使检查可以

在任何日期及该日期的任何时间进行，在临床场所最好拥有一个总能得到的放射性核素源。Tc - 99 m 是一种优选的放射性核素，因为它释放的 γ 射线为 140 KeV，它的物理半衰期为 6 小时，并且一台钼-99/锝-99 m 发生器在临床现场容易获得。现有技术中所用的其它放射性核素，其优点均不及 Tc - 99 m。这是由于这些放射性核素的物理半衰期较长，导致病人所吸收的辐射量较多(例如钼 - 111)。或者，别的一些放射性核素的辐射能量明显低于(例如碘 - 125)或明显高于(例如碘 - 131)Tc - 99 m，因而不适合闪烁照相成像的质量要求。另外，有许多不适宜的放射性核素不能用现场发生器产生。

5 Tc - 99 m 是一种被一个金属螯合部分螯合的过渡金属。能结合 Tc - 99 m 的放射性标记螯合部分能够以共价键与多种特异性结合化合物键合，为放射性标记这些特异性结合化合物提供了一种手段。这是因为通常最易得到的 Tc - 99 m 的化学物种，高锝酸盐(TcO_4)，不能直接与大多数特异性结合化合物牢固地结合而达到可用作一种放射性药物的程度。Tc - 99 m 与放射性标记螯合部分的螯合，通常需要高锝酸盐的化学还原反应，此还原反应需使用
10 一种还原剂如氯化亚锡。

将螯合剂用于 Tc - 99 m 的螯合，在现有技术中是已知的。

Byrne et al., 美国专利 4,434,151 中描述了高半胱氨酸硫代内酯衍生的双官能螯合剂，它能够将放射性核素偶合到末端含有氨基的化合物上，此化合物能定位在一个将被成像的器官或组织中。

20 Fritzberg 美国专利 4,444,690 描述了一系列基于 2,3 - 二(巯基氨基)丙酸酯的锝 - 螯合剂。

Byrne et al., 美国专利 4,571,430 描述了用于螯合放射性核素的新的半胱氨酸硫代内酯双官能螯合剂，它能够将放射性核素偶合到末端含有氨基的化合物上，此化合物能定位于将被成像的器官或组织中。

25 Byrne et al., 美国专利 4,575,556 描述了新的用于螯合放射性核素的高半胱氨酸硫代内酯双官能螯合剂，它能够将放射性核素偶合到末端含有氨基的化合物上，此化合物能定位于将被成像的器官或组织中。

Nosco et al., 美国专利 4,925,650 描述了 Tc - 99 m 螯合物。

Kondo et al., 欧洲专利申请，公开号 483704A，公开了一种用一种巯基
30 - 甘氨酸 - 甘氨酸 - 甘氨酸部分制备一种 Tc - 99 m 螯合物的方法。

欧洲专利申请第 84109831.2 描述了二酰氨基，二巯基 Tc - 99 m 配位体

及其盐用作为肾功能监测剂。

Davison et al., 1981, Inorg. Chem. 20:1629 - 1632 公开了氧锝螯合物。

Fritzberg et al., 1982, J. Nucl. Med. 23:592 - 598 公开了一种基于 N, N'-二(巯基乙酰基)-2,3-二氨基丙酸酯的 Tc - 99 m 螯合剂。

5 Byrne et al., 1983, J. Nucl. Med. 24:P126 描述了含有高半胱氨酸的 Tc - 99 m 螯合剂。

Bryson et al., 1988, Inorg. Chem. 27:2154 - 2161 描述了锝 - 99 的中性螯合物, 它对过量的配位体是不稳定的。

10 Misra et al., 1989, Tet. Lett. 30:1885 - 1888 描述了以放射性标记为目的的二胺二硫羧化合物。

将螯合剂用于放射性标记特异性结合的化合物, 在本领域中是已知的。

Gansow et al., 美国专利 4,472,509 讲述了生产和纯化 Tc - 99 m 螯合-共轭单克隆抗体的方法。

15 Stavrianopoulos, 美国专利 4,943,523 讲述了含有金属螯合部分的可探测性分子。

Fritzberg et al., 欧洲专利申请 86100360.6 描述了二硫羧、二氨基、或二酰氨基羧酸或胺螯合物可用于生产锝 - 标记的成像剂。

20 Albert et al. UK 专利申请 8927255.3 公开了使用 ^{111}In 标记的抑生长素衍生物(如奥曲肽)进行放射性成像, ^{111}In 的标记是通过一个连接于氨基端的螯合基团完成。

Albert et al., 国际专利申请 Wo 91/01144 公开了使用与生长因子、激素、干扰素和胞质分裂素有关的放射性标记肽进行放射性成像, 而且这些放射性标记肽中含有一个与一个放射性核素螯合基团以共价键键合的特异性识别肽。

25 Fischman et al., 国际专利申请, 公开号 Wo 93/13317 中公开了连接于螯合部分的趋化肽。

Kwekkeboom et al., 1991, J. Nucl. Med. 32:981, Abstract#305 涉及带有 ^{111}In 的放射性标记抑生长素的类似物。

30 Albert et al., 1991, Abstract LM 10, 12th American Peptide Symposium: 1991 描述了 ^{111}In 标记的二亚乙基三胺五乙酸衍生的抑生长素类似物的使用。

Cox et al., 1991, Abstract, 7th International Symposium on Radiopharmacology, P, 16 公开了 Tc - 99 m -, ¹³¹I -, 以及 ¹¹¹In - 标记的抑生长素类似物在体内内分泌肿瘤闪烁法放射性定位中的用途。

5 用 Tc - 99 m 标记某种特异性结合化合物的方法, 在现有技术中是已知的。

Hnatowich, 美国专利 4,668,503 描述了 Tc - 99 m 蛋白放射性标记。

Tolman, 美国专利 4,732,684 描述了靶分子与金属硫蛋白片段的共轭。

Nicolotti et al., 美国专利 4,861,869 描述了用于与生物分子(如抗体)形成共轭物的双官能偶联剂。

10 Fritzberg et al., 美国专利 4,965,392 描述了用于标记蛋白的多种基于 S - 保护的巯基乙酰甘氨酸的螯合剂。

Schochat et al., 美国专利 5,061,641 公开了对蛋白进行直接放射性标记, 这种蛋白至少含有一个“侧”巯基。

15 Fritzberg et al., 美国专利 5,091,514 描述了用于标记蛋白的多种基于 S - 保护的巯基乙酰甘氨酸的螯合剂。

Gustavson et al., 美国专利 5,112,953 描述了用于放射性标记蛋白的 Tc - 99 m 螯合剂。

Kasina et al., 美国专利 5,175,257 描述了靶分子和 Tc - 99 m 螯合基团的多种复合物。

20 Dean et al., 美国专利 5,180,816 描述了放射性标记一种蛋白的方法, 它是用 Tc - 99 m 通过一种双官能螯合剂完成的。

Sundrehagen, 国际专利申请, 公开号 Wo 85/03231 中描述用 Tc - 99 m 标记蛋白。

25 Reno 和 Bottino, 欧洲专利申请 87300426.1 公开了用 Tc - 99 m 放射性标记抗体。

Bremer et al., 欧洲专利申请 87118142.6 描述了用 Tc - 99 m 放射性标记抗体分子。

Pak et al., 国际专利申请 Wo 88/07382 描述了一种用 Tc - 99 m 放射性标记抗体的方法。

30 Goedemans et al., PCT 申请 Wo 89/07456 描述了用环状硫羧化合物, 特别是 2 - 亚氨基硫羧烷及其衍生物, 放射性标记蛋白。

Dean et al., 国际专利申请, 公开号 WO 89/12625 中讲述了用于 Tc - 99 m 蛋白标记的双官能偶联剂。

Schoemaker et al., 国际专利申请, 公开号 WO 90/06323 中公开了一类嵌合蛋白, 此蛋白含一个结合金属的区域。

- 5 Thornback et al., EPC 申请 90402206.8 描述了用含硫羧化合物, 特别是 2 - 亚氨基硫羧烷, 制备和使用放射性标记蛋白或肽的方法。

Gustavson et al., 国际专利申请, 公开号 WO 91/09876 中公开了用于放射性标记蛋白的 Tc - 99 m 螯合剂。

- 10 Rhodes, 1974, Sem. Nucl. Med. 4:281 - 293 讲述了用镓 - 99 m 标记人体血清白蛋白。

Khaw et al., 1982, J. Nucl. Med. 23:1011 - 1019 公开了用 Tc - 99 m 标记具有生物活性的大分子的方法。

Schwartz et al., 1991, Bioconjugate Chem. 2:333 描述了用 Tc - 99 m 通过一个胍基烟酰胺基团标记蛋白的方法。

- 15 标记肽的尝试在现有技术中有过报道。

Ege et al., 美国专利 4,832,940 讲述了用于成像定位的 T - 淋巴细胞的放射性标记肽。

Morgan et al., 美国专利 4,986,979 公开了成像感染部位的方法。

- 20 Flanagan et al., 美国专利 5,248,764 描述了一个放射性标记螯合部分与心钠素衍生的肽之间的共轭物。

Ranby et al., 1988, PCT/US 88/02276 公开了一种检测动物体内纤维蛋白沉积的方法, 它包括将一种放射性标记化合物共价结合到纤维蛋白。

Lees et al., 1989, PCT/US 89/01854 讲述了用于动脉造影的放射性标记肽。

- 25 Morgan et al., 国际专利申请, 公开号 WO 90/10463 公开了感染部位成像的方法。

Flanagan et al., 欧洲专利申请 903064285 公开了通过一组有机螯合分子对合成肽进行 TC - 99m 标记。

- 30 Stuttle, PCT 申请, 公开号 WO 90/15818 中描述了用 Tc - 99 m 标记含 RGD 的低聚肽。

Rodwell et al., 1991, PCT/US 91/03116 公开了“分子识别单位”与“效应

结构域”的共轭物。

Cox, 国际专利申请 PCT/US 92/04559 公开了含有二个半胱氨酸残基的放射性标记的抑生长素衍生物。

5 Rhodes et al., 国际专利申请, 公开号 WO 93/12819 中讲述了一类肽, 此肽含有结合了金属离子的结构域。

Lyle et al., 国际专利申请, 公开号 WO 93/15770 中公开了 Tc - 99 m 螯合剂以及用 Tc - 99 m 标记的肽。

Coughlin et al., 国际专利申请, 公开号 WO 93/21151 公开了用于放射性靶标记分子的含硫脲基的双官能螯合剂。

10 Knight et al., 1990, 核医学协会第 37 届年会摘要#209 宣读的使用 Tc - 99 m 标记的肽进行血栓造影。

Babich et al., 1993, J. Nucl. Med. 34:1964 - 1974 描述了含有胍基烟酰胺衍生物的 Tc - 99 m 标记肽。

15 螯合剂用于放射性标记肽的用途以及用 Tc - 99 m 标记肽的方法, 在现有技术中是已知的, 并且已在同时待审的美国专利申请序号 07/653, 012, 07/807, 062, 07/871, 282, 07/886, 752, 07/893, 981, 07/955, 466, 08/019, 864, 和 08/073, 577 中公开。放射性标记肽用作血栓造影的闪烁造影剂, 在现有技术中是已知的, 并且已在同时待审的美国专利申请序号 07/886, 752, 07/893, 981 和 08/044, 825 中公开, 这些均被作为参考文献引用于此。

20

发明概述

25 本发明提供了适用于制备放射性标记的闪烁显影成像剂的试剂。特别是, 本发明提供了制备锝 - 99m (Tc - 99 m) 标记的闪烁成像剂用的试剂。本发明的每种试剂中含有一种特异性结合化合物, 包括(并不局限于)肽, 此化合物能特异性结合哺乳动物体内一种感兴趣的部位, 且与该部位有很高的亲和力, 并且能以共价键与一个结合放射性标记的部分键合。

在一些优选的实施例中, 本发明提出的这些试剂中特异性结合化合物为线性或环状肽, 这种线性或环状肽具有一种 4 至 100 个氨基酸的氨基酸序列。

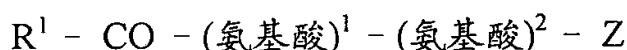
30 一些小化合物, 特别是分子量小于 10,000 道尔顿的小化合物, 具有明显的商业上的优势。如此小的化合物容易生产。再者, 它们很可能不是免疫原性的, 并且能从血管系统迅速清除, 因而能更好更快成像。相反, 较大分子例如片段抗体, 或其它大于 10,000 道尔顿的生物方法衍生的肽, 它们生产成

本高, 并且很可能是免疫原性的, 离开血流更慢, 因此妨碍体内的快速诊断。

另一方面, 本发明提供了制备一种放射性标记闪烁成像剂用的一种试剂, 用于哺乳动物体内一个部位的成像。此试剂包括一种特异性结合化合物, 此化合物与哺乳动物体内的部位特异性地结合, 并共价键合到以下通式 I 或

5 II 的一个结合 Tc - 99 m 的部分。

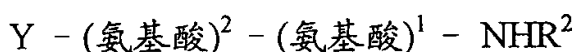
I



其中(氨基酸)¹和(氨基酸)²均为彼此独立的任何一个不含硫羟基的初级α - 或β - 氨基酸, Z是一个含硫羟基的部分, 此部分是半胱氨酸、高半胱氨酸、
10 异半胱氨酸、青霉胺、2 - 巯基乙胺或3 - 巯基丙胺, 而R¹是低级(C¹ - C⁴)烷基、一种氨基酸或一种含2至10个氨基酸的肽。当Z为半胱氨酸、高半胱氨酸、异半胱氨酸或青霉胺时, 上述部分的羰基共价键合到羟基、NR³R⁴基(其中R³和R⁴各自为H或低级(C¹ - C⁴)烷基)、氨基酸或含2至10个氨基酸的肽。

15

II



其中Y是一个含硫羟基的部分, 此部分是半胱氨酸、高半胱氨酸、异半胱氨酸、青霉胺、2 - 巯基乙酸酯或3 - 巯基丙酸酯, (氨基酸)¹和(氨基酸)²均为彼此独立的任意不含硫羟基的初级α - 或β - 氨基酸, 而R²是H或低级(C¹ - C⁴)烷基、一种氨基酸或一种含2至10个氨基酸的肽。当Y是半胱氨酸、
20 高半胱氨酸、异半胱氨酸或青霉胺时, 上述部分的氨基以共价键与 - H, 一种氨基酸或一种含2至10个氨基酸的肽键合。

本发明的 Tc - 99 m 螯合部分通过 R¹、R²、(氨基酸)¹或(氨基酸)²侧链上的一个侧链基团、或者在半胱氨酸、高半胱氨酸、异半胱氨酸或青霉胺中的氨基或羧基, 以共价键与本发明每种试剂中的特异结合化合物键合。
25

在本发明试剂的一个实施方案中, 螯合有放射性标记的部分具有这样一个通式: -(氨基酸)¹-(氨基酸)²-(氨基硫羧)或(巯基羧酸)-(氨基酸)¹-(氨基酸)²-, 其中(氨基酸)¹和(氨基酸)²均为彼此独立的任何天然存在的、经修饰的、经取代的或经替换的初级α - 或β - 氨基酸; (氨基硫羧)是从半胱氨酸、异半胱氨酸、高半胱氨酸、青霉胺、2 - 巯基乙胺和3 - 巯基丙胺中选择; (巯基羧酸)是从半胱氨酸, 异半胱氨酸、高半胱氨酸、青霉胺、2 - 巯基
30

乙酸和 3 - 巯基丙酸中选择。

在一些最佳实施方案中, 本发明的 Tc - 99 m 螯合部分包括化学式为 - Gly - Gly - Cys - 或 Cys - Gly - Gly - 的部分。

5 本发明生产的试剂中, 特异性结合化合物或螯合了放射性标记的部分都以共价键与一个多价键合部分键合。本发明的多价键合部分至少含二个能以共价键与特异性结合化合物或复合了放射性标记的部分结合的相同连接体官能基。优选的连接官能基是伯或仲胺、羟基、羧酸基、或硫羧反应基。在一些优选的实施方案中, 多价键合部分包括双 - 琥珀酰亚胺基甲醚(BSME)、4 - (2,2 - 二甲基乙酰基)苯甲酸(DMAB)、三(琥珀酰亚胺基乙基)胺(TSEA)、4 - (O - CH₂CO - Gly - Gly - Cys 酰胺)苯乙酮(ETAC)、二 - 琥珀酰亚胺基乙烷(BSH)、三(2 - 氯乙酰氨基 - 乙基)胺、和 1,2 - 二 - [2 - (氯乙酰氨基)乙氧基]乙烷。

15 本发明还包括闪烁照相成像剂, 此成像剂是本发明的试剂与 Tc - 99 m 的复合物; 以及包括放射性标记这种试剂的方法。本发明提供的 Tc - 99 m 放射性标记的复合物是通过本发明的试剂与 Tc - 99 m 在一种还原剂的存在下反应生成的。优选的还原剂包括但并不局限于连二亚硫酸盐离子、亚锡离子和亚铁离子。本发明的复合物还可通过用 Tc - 99 m 标记本发明的试剂来形成, 这种标记是通过本发明的一种预先还原的 Tc - 99 m 复合物的配位体交换来完成的。

20 本发明还提供了用于制备闪烁成像剂的试剂盒, 该成像剂即用 Tc - 99 m 标记的本发明的试剂。用 Tc - 99 m 标记本发明试剂的试剂盒包括一个密封的管形瓶, 管形瓶中含有预定量的本发明试剂和用 Tc - 99 m 标记该试剂所需足够量的还原剂。

25 本发明提供通过体外化学合成来制备本发明具体试剂肽的方法。在一个优选实施例中, 肽通过固相肽合成的方法来合成。

本发明提供将闪烁成像剂(即 Tc - 99 m 标记的试剂)用于一哺乳动物体内部位成像的方法, 即进行体内 γ 闪烁照相。此方法包括使用有效诊断量的本发明 Tc - 99 m 标记的试剂, 并通过定位于哺乳动物体内部位的 Tc - 99 m 标记来测定所发射的 γ 射线。

30 从下面某些优选实施例的更详细的描述和权利要求, 将会明显地看出本发明的一些特别优选的实施方案。

附图的简要说明

图 1 显示 Sudan IV 在 4 个经 HC 处理的和 1 个作为对照的兔主动脉中的沉积图样。

图 2 显示放射性示踪物摄取的体外图像以及在 4 个经 HC 处理的和 1 个作为对照的兔主动脉中的斑造影。

图 3 显示在一种动物的放射性示踪物摄取的体内图像以及定位在主动脉弓中的阴影斑。

图 4 显示一个患肿瘤鼠体内 ^{99m}Tc 标记的 P587 的图像(用一箭头表示), 它表明在下腿肿瘤部位的摄取高。

优选实施方案的详细描述

本发明提供用于制备 Tc - 99 m 标记闪烁成像剂的试剂(包括肽试剂), 此成像剂用于哺乳动物体内靶位置的显影。本发明提供的试剂包括一种以共价键与一种特异性结合化合物键合的放射性标记复合部分, 此特异性结合化合物是用 Tc - 99 m 放射性标记的结合到哺乳动物体内的一个位置上。

用 Tc - 99 m 标记是本发明的一个优点, 因为这种同位素的核的特性和放射性的特性使它成为一种理想的闪烁成像剂。此同位素有 140 KeV 的单光子能量, 其放射性半衰期为 6 小时, 并且容易从一种 $^{99}\text{Mo} - ^{99m}\text{Tc}$ 发生器中得到。本发明的另一优点是: 与本领域中已知的其它放射性核素(例如 ^{125}I) 相反, 其优选放射性核素中没有一个是具有毒性的。

本发明中, “特异性结合化合物” 一词的含义是该化合物是能特异性地与哺乳动物体内的一个靶位置结合的任意化合物。“特异性结合” 将被本领域的普通技术人员理解为: 化合物定位于组织周围较大范围的靶位置。如此的特异性结合是有益处的, 因为含有此特异性结合化合物的闪烁成像剂分布于在给药之后的一哺乳动物体内, 以使用视觉确定体内的靶位置。特异性结合化合物包括(并不局限于)肽、低聚糖、核苷酸、低聚核苷酸和多聚核苷酸、以及特异性结合了受体的化合物。

本发明的每种含特异性结合肽的实例是一个氨基酸序列。本发明中所用的氨基酸一词将包括天然的、经修饰的、经取代的、经替代的等等所有 L - 和 D - 的初级 α - 和 β - 氨基酸。

本发明试剂的特异性结合肽实例包括分子量约为 5,000 道尔顿的特异性结合肽。本发明特异性结合肽的特别优选实例包括以高亲和力结合到血小板

GPIIb/IIIa 受体的肽。在其他优选的实例中，特异性结合肽包括与位于 SSTR 表达细胞，尤其是肿瘤细胞和激活的 T - 淋巴细胞上的抑生长素受体(SSTR) 特异性结合的肽。本发明含特异性结合肽的试剂包括(并不局限于)这样一些试剂，它们包含下列氨基酸序列的肽。(除非注明，下列肽中的氨基酸为 L - 氨基酸)。

- 5 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCK.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCR.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCRD.酰胺)
- 10 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCRK.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCRR.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCKK.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCKKK.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.Orn.酰胺)
- 15 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGCKDK.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.Orn.D.Orn.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GGC.Orn.D.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.KKC.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.KRC.酰胺)
- 20 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.RRC.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.KKCK.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GRCK.酰胺)
- 环(N - 甲基)FYW_DKV.Hcy.(CH₂CO.GKCR.酰胺)
- CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGC_{Acm}GC_{Acm}GGC.酰胺
- 25 CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGC_{Acm}GC_{Acm}GGCG.酰胺
- CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGSSGGCG.酰胺
- CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGCG.酰胺
- CH₂CO.Y_D.Amp.GDCKGCG.酰胺
- GRGDGGC
- 30 GLFCGC.酰胺
- GRGDGGGGC

F_DFYW_DKTFTGGC.酰胺

乙酰基.CGGY.[(CH₂)₄ - 哌啶]

(氨基酸的单字母缩写见于 G. Zubay, Biochemistry(2d, ed), 1988(MacMillen Publishing: New York) P. 33 其他缩写如表 1 中的符号说明)。

5 这里所提供的这个试剂表是为了说明本发明, 而限于所列出的这些试剂, 也不排除其它试剂, 本领域的普通技术人员可将其理解为: 本发明公开这些的肽或由其等同物复合的试剂, 可以以共价键与本发明的任何螯合部分结合, 并且属于本发明的范围。这些试剂包括: 这种肽与含本发明公开的连接基团的螯合部分的复合物。

10 为达到最佳成像效果, 本发明使用的试剂必须能够以足够高的亲合力结合到血小板 GPIIb/IIIa 受体。在所给浓度不高于 0.3 μ M 的一个普通血小板凝集试验中(参看下列实施例 3)该亲合力能够抑制由二磷酸腺苷(ADP)引发的人血小板的凝集。

在本发明的某些具体试剂中, β 葡聚糖包含特异性结合化合物的成分。

15 本发明中, “ β - 葡聚糖”是指这样的一些低聚糖, 它们包含有 1, 3 - 和 1, 6 - 键合的 β - D - 葡萄糖残基, 其中 β - 葡聚糖部分的分子量可达 2,000 千道尔顿左右。本发明含 β - 葡聚糖的试剂的一个优选实施例所具有的通式为:

β - 葡聚糖 - (=NNHCO(CH₂)₂CO.)GGC.酰胺

20 多价键合部分都是以共价键与本发明的特异性肽结合, 与 Tc - 99 m 螯合部分结合, 或者与它们二者均结合。本发明所提供的多价键合部分至少包含 2 个结合官能团能以共价键与特异性结合肽或 Tc - 99 m 螯合部分结合。此官能基团包括(但并不局限于)伯和仲胺、羟基、羧酸基和硫羟反应基。多价键合部分所含的官能团最好不少于三个, 此官能基能以共价键结合到特异性结合的肽或 Tc - 99 m 螯合部分。优选的多价键合部分包括氨基酸如赖氨酸、高赖氨酸、鸟氨酸、天冬氨酸和谷氨酸; 线性和环状胺和聚胺; 聚羧酸; 以及激活的硫羟如二 - 和三 - 马来酰亚胺。也优选其中多价键合部分包含了许多多价键合部分, 它们共价结合形成一个多价键合部分的支链。

25 含有本发明试剂的特异性结合肽可以在体外化学合成。有意义的是, 这样的肽通常可以在一个氨基酸合成物上制备。在合成本发明的肽的过程中所使用的技术对本领域的普通技术人员是已知的, 在体外化学合成中, 放射性

标记结合部分以共价键与肽键合。合成中的这种以共价键与放射性标记结合部分键合的肽其优点是共价键合的特异性部位是能确定的。

在本发明的肽合成过程中，放射性标记整合部分可以进入靶特异性肽。此放射性标记整合部分可以进入肽以构成此肽的端氨基或端羧基。另外，放射性标记整合部分可以共价结合到氨基酸侧链的基团，例如赖氨酸的 ϵ -氨基，得到 $2N(\text{Fmoc})-\text{Lys}-\epsilon\text{N}[\text{Gly}-\text{Gly}-\text{Cys}]$ ，它们可以被结合在肽链的任何位置。这种序列是特别有意义的，因为它提供了一种容易与靶结合的肽结合的方式。本发明中，这些整合剂实际上可以结合到任何的肽中，从而使一种放射性标记的肽以共价键与一个 $\text{Tc}-99\text{m}$ 整合部分键合。

10 铈螯合物(优选 $\text{Tc}-99\text{m}$ 高铈酸盐)与本发明的试剂在一种还原剂存在下反应生成一种放射性铈与本发明试剂的配合物。优选的还原剂为连二亚硫酸盐、亚锡和亚铁离子；最优选的还原剂为氯化亚铁。在另一个优选实施方案中，该还原剂为一种固相还原剂。为方便起见，以一种试剂盒的形式提供了配合物和用于制备这种配合物的方法。此试剂盒包括一个密封的管形瓶，
15 瓶中含有预先确定好量的一种待标记的本发明试剂，以及一种其量足以用 $\text{Tc}-99\text{m}$ 标记该试剂的还原剂。或者，此配合物的生成还可通过一个本发明的试剂与一种由铈和另一种化合物(已知可作为转移配位体的)预选形成的不稳定配合物发生反应。这种方法被称作配位体交换，是本领域普通技术人员已知的。此不稳定的配合物可以通过使用如酒石酸、柠檬酸、葡糖酸盐或甘露糖醇等的转移配位体来形成。在本发明用的 $\text{Tc}-99\text{m}$ 高铈酸盐中包括的是
20 碱金属盐，如钠盐或铵盐或低级烷铵盐。

在本发明的一个优选实施方案中，用于制备铈- 99m 标记的试剂是一种试剂盒。将适量的一种试剂加入一个管形瓶中，此瓶含有一种还原剂，例如氯化亚锡或一种固相还原剂，其剂量足以用于 $\text{Tc}-99\text{m}$ 对该试剂的标记。
25 此瓶中还可以含有一种适量的如上所述的转移配位体(例如酒石酸、柠檬酸、葡糖酸盐或甘露糖醇)。本发明的铈- 99m 标记的闪烁成像剂可以通过将适量的 $\text{Tc}-99\text{m}$ 或 $\text{Tc}-99\text{m}$ 配合物加入此管形瓶，并在如下实施例2中所述的条件下反应而生成。此试剂盒还可以含有常规的药物添加剂例如用于调节渗透压的药用盐、缓冲剂、防腐剂等。试剂盒中的组分可以是液体、冷冻
30 或干燥形式。在一个优选的实施方案中，该试剂盒的组分是冻干的形式。本发明的放射性标记闪烁成像剂可以通过在如下实施例2中所述条件下的反应

来制备。

本发明提供的放射性标记试剂有一个适当的放射量。在形成 Tc - 99 m 放射性配合物时，通常优选形成的放射性配合物其溶液中的放射性浓度为每毫升约 0.01 毫居里(mCi)至 100 mCi 较好。

5 本发明提供的镓 - 99 m 标记的闪烁成像剂可以用于显示哺乳动物体内部位，按照本发明，镓 - 99 m 标记的闪烁成像剂以单个单位的注射剂量给药。按照本发明，本领域普通技术人员已知的任何常用载体如消毒盐水溶液或浆均可在放射性标记后使用，用于制备注射溶液来诊断成像各器官、肿瘤等等。通常，所给的单位剂量的辐射为 0.01 mCi 左右至 100 mCi 左右，优选
10 1 mCi 至 20 mCi。以单位剂量注射的溶液为 0.01 mL 左右至 10 mL 左右。静脉内给药后几分钟可使体内器官或肿瘤成像。但是，如果需要，可以在将放射性标记试剂注射入病人体内几小时后(或者甚至更长时间)才成像。在许多情况下，所给充足剂量的药物将在待显影的区域积累约 0.1 小时内即可进行闪烁照相。以诊断为目的的任何常规闪烁成像方法均可用于本发明。

15 本发明提供的镓 - 99 m 标记的试剂和配合物，可以在静脉内注射用的任何常规介质中静脉内给药，该介质如一种盐水或血浆。这些介质还可含有常规的药物添加剂如用于调节渗透压的药用盐、缓冲剂、防腐剂等等。其中生理盐水和血浆为优选介质。

在下列的实施例中更充分地说明了生产和标记这些化合物的方法。这些
20 实施例说明上述方法的某些方面和有益效果。这些实施例是用于说明本发明而并非用于限制本发明。

实施例 1

固相肽的合成

使用一种应用生物合成模型 431A 肽合成器并使用 9 - 芴基甲氧基羰基
25 (Fmoc)端氨基保护，与二环己基碳二亚胺/羟基苯并三唑 2 - (1H - 苯并 - 三唑 - 1 - 基) - 1, 1, 3, 3 - 四甲基脲 六氟磷酸盐/羟基苯并三唑 (HBTU/HOBT)偶合，并使用对羟甲基苯氧基 - 甲基聚苯乙烯(HMP)或用于端羧基酸的 Sasrin[™] 树脂或用于端羧基酰胺的 Rink 酰胺树脂，在 0.25 毫摩尔 (mmole)的规模下，进行固相肽合成(SPPS)。

30 高半胱氨酸是通过 L - 高半胱氨酸内酯的碱性水解制备。Fmoc Hcy(S - 三苯甲游基)和 Fmoc Pen(S - 三苯甲游基)是通过将其与三氟乙酸中的三苯

甲醇发生三苯甲基化作用，然后进行如 Atherton et al., (1989, Solid Phase Peptide Synthesis, IRL Press: Oxford)中所述的 Fmoc 衍生而制备。以 Fmoc - 酪氨酸 - CA - Boc - 哌啶丁醚)作为起始物质，通过 SPPS 制备酪氨酸的 4 - 哌啶甲醚衍生物(Y[(CH₂)₄ - 哌啶])。用 L - 半胱氨酸和 Boc - 氨丙基溴化物，用甲醇钠甲醇盐制备 Fmoc - S - (3 - Boc - 氨丙基)半胱氨酸，然后在 pH 10 下，用 0 - 9 - 芴甲基 - O' - N - 琥珀酰亚胺基碳酸盐(FmocOsu)处理。

在适当的情况下，或者通过使用适宜的 2 - 卤乙酸作为 SPPS 过程中将要被偶合的最后一个残基，或者通过用 NMP 中的 2 - 卤乙酸/二异丙基碳化二酰亚胺/N - 羧基琥珀酰亚胺，或 NMP 中的 2 - 卤 - 乙酰/二异丙基乙胺处理结合于此树脂的 N - 末端游离氨基肽，引入 2 - 卤乙酰基。

在适当的情况下，将一种 0.1 - 1.0 mg/mL 溶液搅拌 4 - 48 小时，使 2 - 卤乙酰化肽环化。此溶液为含 0.5 - 1.0 mM EDTA 的磷酸盐或碳酸氢盐缓冲液或稀氢氧化铵溶液(pH 8)。然后，用乙酸酸化，冷冻干燥并进行 HPLC 纯化。

在适当的情况下，使含巯基的肽与含氯乙酰基并巯基保护的 Tc - 99 m 螯合部分(pH 为 10)在室温下反应 0.5 - 4 小时，然后经乙酸酸化，并蒸发此溶液以获得相应的肽 - 硫化物加合物。如上所述，进行常规的脱保护和纯化，以获得此螯合剂 - 肽共轭物。

使用一种含 1 % TFA 的二氯甲烷溶液裂解结合有 SarsinTM 树脂的肽，获得此受保护的肽。在适当的情况下，通过使用二苯磷酰基叠氮化物使侧链保护的端氨基游离胺和端羧基游离酸发生反应，使受保护的肽前体在端氨基和端羧基之间发生环化。

使用一种含有三氟乙酸(TFA)，或 TFA 和二氯甲烷，还可含水、苯硫基甲烷、乙烷二硫酚和三乙基硅烷，其比例为 100:5:5:2.5:2 的溶液，在室温下，对 HMP 或 Rink 酰胺树脂结合产物进行常规裂解并对受保护的环化肽进行脱保护，时间为 0.5 - 3 小时。用三苯酚甲醇/TFA 对产物进行重 - S - 三甲基化，并用(Boc)₂O 将 N - Boc 基团再引入此肽。

粗肽的纯化是通过制备高压液相层析(HPLC)，其中使用一种 Waters Delta - Pak C18 层析柱，并用含 0.1 % TFA 的经乙腈修饰的水作梯度洗脱。柱洗脱后，将乙腈从洗脱出的部分中蒸发掉，然后对剩余部分进行冷冻干燥。通过快速原子撞击质谱分析(FABMS)或电子喷雾质谱分析(ESMS)证实每种

如此产生和纯化的产品是相同的。

实施例 2

一种用 Tc - 99 m 进行放射性标记的常用方法

将 0.1 mg 实施例 1 制备的肽试剂溶于 0.1 ml 水, 或 50:50 的乙醇水溶液,
5 或磷酸盐缓冲的盐水(PBS), 或 50 mM 磷酸钾缓冲液(pH = 5, 6 或 7.4)。Tc
- 99 m 葡庚糖酸盐的制备如下: 取用一个 Glucoscan 管形瓶(E. I. DuPont de
Nemours, Inc), 其中装有 1.0 ml Tc - 99 m 高锝酸钠, 最多含 200 mCi, 并使
之在室温下保持 15 分钟。然后将 25 ml Tc - 99 m 葡庚糖酸盐加入试剂中,
使反应在室温或 100 °C 下持续进行 15 - 30 分钟, 然后用一个 0.2 μ m 的过
10 滤器过滤。

通过 HPLC 测定 Tc - 99 m 标记肽试剂的纯度, HPLC 所使用的条件
为: 用每种放射性标记肽填充大小为 5 μ m $\times$ 4.6 mm $\times$ 220 mm 的 Waters
Delta - Pak RP - 18 分析柱, 然后以 1 mL/min 的溶剂流速洗脱, 梯度洗脱
需要进行 10 - 20 分钟, 所用的线性梯度以 100 % 溶剂 A(0.1 % TFA/水)开
15 始, 以 100 % 溶液 B(0.1 % TFA/90 % 乙腈/水)结束。通过一台联机的放射性
检测器检测放射性成分, 而且在放射性检测器上联有一台积分记录器。在此
条件下, 用 1 至 4 分钟时间, 洗脱出 Tc - 99 m 葡庚糖酸盐和 Tc - 99 m 高
锝酸钠, 而要洗脱出 Tc - 99 m 标记的肽则需要一段长得多的时间。

下表说明了 Tc - 99 m 对肽的成功标记, 此肽是按照实施例 1 所述的方法
20 制备的。

25

30

表 1

肽	FAB/MS MH ⁺	放射化学药品 收率(%) [*]	HPLC RT(min) ^{**}
环(N - 甲基)FYW _D KV.Hcy.(CH ₂ CO.GGC.酰胺)	1129	98 ⁴	15.1, 17.2
环(N - 甲基)FYW _D KV.Hcy.(CH ₂ CO.GGCK.酰胺)	1258	99 ⁴	15.0
环(N - 甲基)FYW _D KV.Hcy.(CH ₂ CO.GGCR.酰胺)	1285	99 ¹	15.1
环(N - 甲基)FYW _D KV.Hcy.(CH ₂ CO.GGCKK.酰胺)	1386	N.D.	N.D.
环(N - 甲基)FYW _D KV.Hcy.(CH ₂ CO.GGC.Orn.酰胺)	1244	98 ⁶	7.0 ¹
CH ₂ CO.Y _D .Apc.GDCGGC _{Acm} GC _{Acm} GGC.酰胺	1393	97 ⁴	11.4 ³
CH ₂ CO.Y _D .Apc.GDCGGSSGGCG.酰胺	1219	N.D.	N.D.
CH ₂ CO.Y _D .Apc.GDCGGCG.酰胺	930	99	11.3 ³
CH ₂ CO.Y _D .Apc.GDCGGC _{Acm} GC _{Acm} GGCG.酰胺	1450 ⁷	N.D.	N.D.
F _D FYW _D KTFGTGGC.酰胺	1356	99 ⁴	15.2, 16.2
GRDGGC	769	98 ²	13.0, 13.6, 14.7 ³
GRDGGGGC	735	100 ¹	14.9, 15.1, 15.4 ²

*是指下列的标记条件:

1 = 在水中, 室温下

2 = 在 0.05 M 磷酸盐中, pH 7.4, 室温下

3 = 在 10 % HPCD 中, 室温下

5 4 = 在 50/50 的乙醇/水中, 室温下

5 = pH 为 9, 100 °C 下

6 = 在 0.9 % NaCl 中, 100 °C 下

** HPLC 的方法(用 R_T 后的上角标表示):

1 = Waters - 1 层析柱, 100 % 溶液 A → 100 % 溶液 B, 10 分钟

10 2 = Vydac 层析柱, 100 % 溶液 A → 100 % 溶液 B, 10 分钟

3 = Waters - 2 层析柱, 100 % 溶液 A → 100 % 溶液 B, 20 分钟

15 氨基酸的单字母缩写字见 G. Zubay, Biochemistry(2d. ed.), 1988(MacMillen Publishing: New York)P. 33。下面划底线的表示在衍生基团中结合的氨基酸之间形成一个酰胺或硫羧键。Acm 是乙酰氨基甲基; Orn 是鸟氨酸; F_D 是 D - 苯内氨酸; Y_D 是 D - 酪氨酸; W_D 是 D - 色氨酸; APC = L - [S - (3 - 氨基丙基)]半胱氨酸; Amp 是 4 - 脒基 - 苯丙氨酸; 以及 Hcy 是高半胱氨酸。

实施例 3

抑制血小板凝集试验

20 如 Zucker(1989, Methods in Enzymol, 169: 117 - 133)中所述, 对血小板凝集作了基本研究。简单地讲, 在有或没有公认的血小板凝集抑制化合物的情况下, 通过富含血小板的人血浆(每毫升含 300,000 个血小板)进行血小板凝集试验。加入一种最终浓度为 10 - 15 毫摩尔的二磷酸腺苷溶液, 使血小板发生凝集, 用一种 Bio/Data 聚集计(Bio/Data Corp., Horsham, PA)监测血小板凝集程度。所用的血小板凝集抑制性化合物的浓度在 0.1 至 500 μ g/mL 范围内变化。从抑制剂浓度 - 血小板凝集程度的图表中, 确定这种能将血小板凝集程度减少到 50 % 的抑制剂的浓度(称作 IC_{50})。将一种肽 RGDS 的抑制曲线确定为每批试验血小板的阳性对照。

30 这些试验结果显示于表 II 中。表 II 中的试验化合物如下(RGDS 为阳性对照):

表 II

	P686 = <u>CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGSSGGCG</u> .酰胺	IC ₅₀ = 0.34μM
	P246 = <u>CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGC_{Acm}GC_{Acm}GGC</u> .酰胺	IC ₅₀ = 0.63μM
5	P645 = <u>CH₂CO.Y_D.Amp.GDCGGC_{Acm}GC_{Acm}GGC</u> .酰胺	IC ₅₀ = 0.67μM
	P665 = <u>CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGSSGGCG</u> .酰胺	IC ₅₀ = 0.80μM
	P676 = <u>CH₂CO.Y_D.Apc.GDCGGC_{Acm}GC_{Acm}GGCG</u> .酰胺	IC ₅₀ = 0.97μM

(如表 1 附注说明中所述, 氨基酸的单字母缩写见于 G. Zubay, Biochemistry(2d. ed), 1988(MacMillen Publishing: New York)P. 33; Ac_m = 乙酰氨基甲基; Amp = 4 - 脒基苯丙氨酸; Apc = L - [S - (3 - 氨基丙基)]半胱氨酸; Y_D = D - 酪氨酸。)

这些结果说明, 本发明肽试剂在体外能以高亲合力与特异性 GPIIb/IIIa 受体结合。

实施例 4

在犬模型中使用 Tc - 99 m 标记肽的体内深度静脉血栓造影

用复合的氯胺酮和马来酸乙酰丙嗪肌内给药使杂种犬(25 - 35 磅, 紧紧关闭一夜)镇静, 然后通过静脉内给戊巴比妥钠将其麻醉。将一个 18 号导管插入每只动物的右股静脉中间处, 并将一个 8 mm 涤纶纤维(Dacron)缠绕的不锈钢圈(Cook Co. Bloomington IN)放入大约在股骨中段处的股静脉中。取出导管, 用 X 射线记录缝合的伤口和钢圈的位置。然后让动物恢复过夜。

放置钢圈后的第二天, 再次麻醉每只动物, 从每一只前腿的静脉滴入盐水, 并插入膀胱导尿管收集尿液。将动物面向上放于一台 γ 照相机下, 此 γ 照相机上装有一低辐射能平行光管, 对 Tc - 99 m 进行峰值照相。然后将 Tc - 99 m 标记的肽[185 - 370 mBq(5 - 10 mCi)Tc - 99 m, 0.2 - 0.4 mg 试剂]在插入点注射入一只前腿的静脉中。保留第二条静脉用于收集血液。

注射的同时, 开始进行 γ 照相造影。对在第一个 10 分钟期间所获得的肝脏前像做一个动态观察(10 秒获一个像), 然后在注射后的第 1、2、3 和 4 小时作静止照相。观察 500,000 计数或 20 分钟(按较短的时间), 大约在 10 - 20 分钟时获得腿的前像, 然后在注射后的大约 1、2、3 和 4 小时, 获得腿的前像。用一个放置于膀胱前的铅防护板接收腿的相。

接收完最后一张像后, 用戊巴比妥对每只动物进行深麻醉。用一个带有

肝素的注射器进行心内穿刺，收集两份血样。然后将安然致死量的饱和氯化钾溶液心内给药或将其药大剂量注射入静脉内。将含有血栓的股静脉、对照腿静脉的相似部分、邻近血栓的血管部分和大腿肌肉试样仔细解剖下来。然后将血栓、圈和涤纶纤维圈剖出血管。将血栓、盐水冲洗后的血管样、圈和圈涤纶纤维分离，并将每个样品放置于一个预先称重的试管。将样品连同已知注射量的部分一起称重并在 Tc - 99 m 管的 γ 射线井式计数器中计数。

确定新鲜血栓重量、在致死前所获得的血栓及血样中的注射剂量百分比 (% ID)、以及血栓/血和血栓/肌肉的比率。在计算机所存像中，从描绘血栓和相邻肌肉的有关区域测定数/象素，通过分析此数/象素确定血栓/背景的比率。

实施例 5

应用 Tc - 99 m 标记化合物 P₂₁₅ 的高胆固醇家兔模型进行动脉粥样硬化斑的定位和体内成像

将重 2 - 3 kg 的两种性别的新西兰白色(NZW)分成两组。对照组由六只用市售兔食(Purina)喂养的家兔组成。高胆固醇(HC)组由 16 只兔组成，用标准的富含胆固醇饮食(兔食的胆固醇浓度混合至 1 % w/w)喂养 7 至 28 周。所有的动物随意给水。

如 上 所 述 制 备 Tc - 99 m 标 记 的 P199(巯基 乙酰基 GGGRALVDTLKFVTQAEGAK. 酰胺)。用 200 - 200 mCi 的 Tc - 99 m 标记约 1000 μ g 肽，并制备成单位剂量为 0.5 - 2 ml 体积中含有 5 - 10 mCi(12.5 - 20.0 μ g/兔; 6 - 7 μ g/kg)。以大剂量缓慢(大约 0.1 mL/min)注入一只耳静脉，完成对成年兔进行 Tc - 99 m 标记肽的静脉内给药。 γ 照相机装配有为 Tc - 99 m 而设的针孔平行光管(5 mm 孔隙)和能量辐射窗，并设定有程序用来在所要求时间内累积 5000,000 计数或进行扫描。造影前，用氯胺酮和盐酸赛拉嗪的混合液(5:1, 1 mL/kg 肌肉)麻醉动物。

在心脏上方 40° - 50° 得到 γ 照相的像(在前斜(LAO)像，以显示主动脉弓和降主动脉。在注射后 15 分钟和 2 小时获得像。在每次照取像前，如果有必要可补充注射麻醉剂。

在 2.5 小时(2 小时扫描之后)，用静脉内注射戊巴比安钠将动物处死。解剖时，取出主动脉，游离出从主动脉瓣到中腹区域的分支血管。使用一个平行孔光管，对主动脉进行体外造影。然后，将主动脉纵向切开，用 Sudan IV

染色，使动脉硬化斑变成深砖红色。在此情况下无脂未损害的主动脉内皮仍保持正常的、粉白色光泽外表。

这些试验结果显示于附图 1 - 3 中。两组兔对 Tc - 99 m P199 均能快速全身清除。对照组(无斑)主动脉只在注射后的很短时间内看到，原因是由于血中放射性物质循环。体外显影时，每一只高胆固醇(HC)喂养的兔主动脉的斑分布有独特的图像和强度。虽然所有的 HC 主动脉和具有的放射积累量不同，但是这与主动脉弓区域沉积最多，在主动脉的远端和中端沉积较少的现象是相符的。

观察到经 HC 处理的兔主动脉的体内体外 Tc - 99 m P199 像与在 HC 处理兔主动脉内 Sudan IV 的沉积图像之间存在正相关关系。相反，对照兔主动脉没有任何区域摄取标记肽。附图 1 显示了 4 只经 HC 处理的兔主动脉和 1 只对照兔主动脉的 Sudan IV 的沉积图像。暗区表示动脉粥样硬化斑的位置。附图 2 显示了其相应的体外图像，它表明在放射性示踪物摄取和斑显影之间是彼此相应的。附图 3 显示了一种摄取了放射性示踪物的动脉的体内成像，在主动脉弓处有斑定位显影。

这些结果说明：Tc - 99 m 标记 P199 能够显影动物中的动脉粥样硬化斑，并且它能够被高摄取，迅速清除，能尽早观察到。另外，正常的主动脉组织显示出对标记 P 199 的摄取量达到最低，因此降低了闪烁显影的假阳性的可能性。

实施例 6

在受感染动物模型中 Tc - 99 m 标记肽的闪烁成像和生物分布

在两种性别重 2 - 3 kg 的新西兰白兔(NZW)的左小腿处进行肌肉内接种一有效的大肠杆菌(*Eschevichia Coli*)菌株。24 小时后，通过肌肉内注射氯胺酮和盐酸赛拉嗪使动物镇静，然后注射 Tc - 99 m 标记肽(2 - 10 mCi, $\leq 150 \mu\text{g}$)。然后将动脉面朝上定位于将要用来造影的 γ 照相机(LEAP 平行先管/Tc - 99 m 峰值照相)的视野区域。动物在注射一小时后造影，然后在以后的三个小时中大约每隔一小时进行一次造影。在每次造影之间动物可以复苏，如果需要可进行再麻醉。

做完最后一次造影后，用静脉内注射过量的戊巴比妥钠将每只动物处死，然后解剖获得血样、感染的组织和对照组织样。称重组织样并用一个 γ 射线计数器计数；与每个样品对应计数注射剂量的标准量，将此作为对照。

通过这些数据确定保留在每个组织样品中的每克组织的注射剂量的百分比。然后，计算每种肽的每克感染组织与非感染肌肉组织、以及感染肌肉组织与血的注射剂量的百分比，说明本发明放射性标记闪烁显影剂的特异定位。

实施例 7

5 结合到 AR42J 小鼠胰管肿瘤细胞膜的 $[^{125}\text{I} - \text{Tyr}^{11}]$

抑生长素 - 14 的抑制作用

测定肽试剂介导的抑制作用对一种放射性标记的抑生长素类似物与含有抑生长素受体的细胞膜结合的抑制，说明了本发明的各种抑生长素类似物在体外与抑生长素受体结合的能力。

- 10 在 37 °C，加湿的 5 % CO_2 空气中，在添加有 10 % 小牛血清(FCS)和 8 mM 谷氨酸的 Dulbecco 修饰的基本介质(DMEM)中，培养表达抑生长素受体的小鼠胰管肿瘤细胞系 AR42J。在低温缓冲液(50 mM Tris - HCl, pH 7.4)中匀化所获细胞，然后在 4 °C 下，以 39,000 g 将匀浆离心。用缓冲液将颗粒冲洗一次，然后再次悬浮于冰冷的 10mM Tris - HCl 缓冲液中(pH 7.4)。此细胞膜制
- 15 剂的等份试样在 30 °C 下，用 750,000 cpm/ml 下最终浓度为 0.5nM，特异活性为 2000 Ci/mmol 的 $[^{125}\text{I} - \text{Tyr}^{11}]$ 抑生长素 - 14(Amersham, Arlington Heights, IL)和本发明的一种肽或肽铈螯合物(在 50 mM HEPES 缓冲液中最终浓度在 10^{-11} 至 10^{-6} M 之间，pH 值为 7.4，其含有 1 % 牛血清白蛋白，5 mM MgCl_2 ，0.02 mg/ml 的杆菌肽，0.02 mg/ml 苯基甲基磺酰氟化物和 200,000 IU
- 20 Trasylol)培养 25 分钟。

- 培养后，用一过滤歧管将此细胞膜混合液通过一个经聚乙烯亚胺冲洗的 GC/F 过滤器(Whatman Ltd., Maidstone, England)过滤，并且用 5 ml 低温 HEPES 缓冲液冲洗留于过滤纸上的残余物 3 次，在 γ - 计数器上计数此滤纸和滤纸冲洗物。在 200 mM 未标记抑生长素 - 14 的存在下，进行与上述基本相同的
- 25 测定来评价非特异性结合。数据分析包括能够获得抑制常数的 Hill 数据图表，此抑制常数如 Bylund 和 Yamamura 所述(1990, Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis, Yamamura et al., eds., Raven Press: N. Y)。使用本发明的试剂进行测定所获得的结果，如下所示：

表 III

	肽	K _d (nM)
	环(N - 甲基)FYW _D KV.Hcy.(CH ₂ CO.GGCKK.酰胺)	0.26
5	环(N - 甲基)FYW _D KV.Hcy.(CH ₂ CO.GGCK.酰胺)	2.5
	环(N - 甲基)FYW _D KV.Hcy.(CH ₂ CO.GGC.酰胺)	2.6

这些结果说明：本发明的肽试剂在体外以高亲合力与抑生长素受体结合。

10

实施例 8

在小鼠中表达肿瘤的抑生长素受体(SSTR)的定位和体内成像

基本按照 Bakker et al. (1991, Life Sciences49:1593 - 1601)所述，进行由小鼠肿瘤细胞表达的抑生长素受体的体内成像。

15 将从冷冻的肿瘤糊中解冻的 CA20948 小鼠胰管肿瘤细胞，以肌肉注射一种 0.05 - 0.1 mL/只动物的方式在 Lewis 小鼠的右后腿植入 6 周。使肿瘤生长到约 0.5 - 2 g，收取该肿瘤并用肿瘤糊植入第二组未携带肿瘤细胞的 Lewis 小鼠中。以这种方式重复传递，产生连续几代患肿瘤的动物。用于体内研究的患肿瘤的动物通常为第三至第五代，并且带有 0.2 - 2 g 的肿瘤。

20 为研究放射性示踪物在肿瘤中的特异性定位，在所选动物注射放射性示踪物之前 30 分钟，皮下给阻断 SSTP 剂量(4 mg/kg)的奥曲肽(此方案由 Bakker et al. 表明：能够将 ¹¹¹In - [DTPA]奥曲肽的肿瘤摄取降低至原来的 40 %)。

以 0.15 - 0.20 mCi ^{99m}Tc 标记的肽(对应为 0.2 至 0.4 ml 中含 3 至 8 μg 肽)通过背部的尾静脉进行静脉内注射播种入患有第 3 至第 5 继代移植的 CA20948 肿瘤的 Lewis 小鼠中。

25 在选定的时间，通过颈错位将动物处死，进行选择牲尸体解剖。将所得的组织样品称重，连同注射剂量的一份一起用一个 γ 射线井式计数器计数。

所选择的放射性标记肽的 90 分钟生物分布结果，显示于表 IV 中。值得注意的是，^{99m}Tc - P587，^{99m}Tc - P617，^{99m}Tc - P726 和 ^{99m}Tc - P736 显示出很高的肿瘤摄取和很高的肿瘤/血比率，这说明它们在靶(肿瘤)组织中具
30 有高的特异性摄取。

附图 4 显示了一只患肿瘤小鼠的一张 ^{99m}Tc - P587 的像。从中可以明显

看到：在患病腿的肿瘤中具有高摄取。

应该理解到：上面所公开的内容强调的是本发明的某些特殊实施例，与它们相应的修饰和同等替换均在如权利要求中所提出的本发明的构思和范围内。

表 IV

No.	肽	肿瘤	%ID/g	
			血	肿瘤/血
P736	环(N - 甲基)FYW ₀ KV.Hcy.(CH ₃ CO.GGCRK.酰胺)	2.1	0.24	9
P587	环(N - 甲基)FYW ₀ KV.Hcy.(CH ₃ CO.GGCK.酰胺)	3.4	0.61	6
P617	环(N - 甲基)FYW ₀ KV.Hcy.(CH ₃ CO.GGCR.酰胺)	6.7	0.73	9
P726	环(N - 甲基)FYW ₀ KV.Hcy.(CH ₃ CO.KKC.酰胺)	2.5	0.30	8

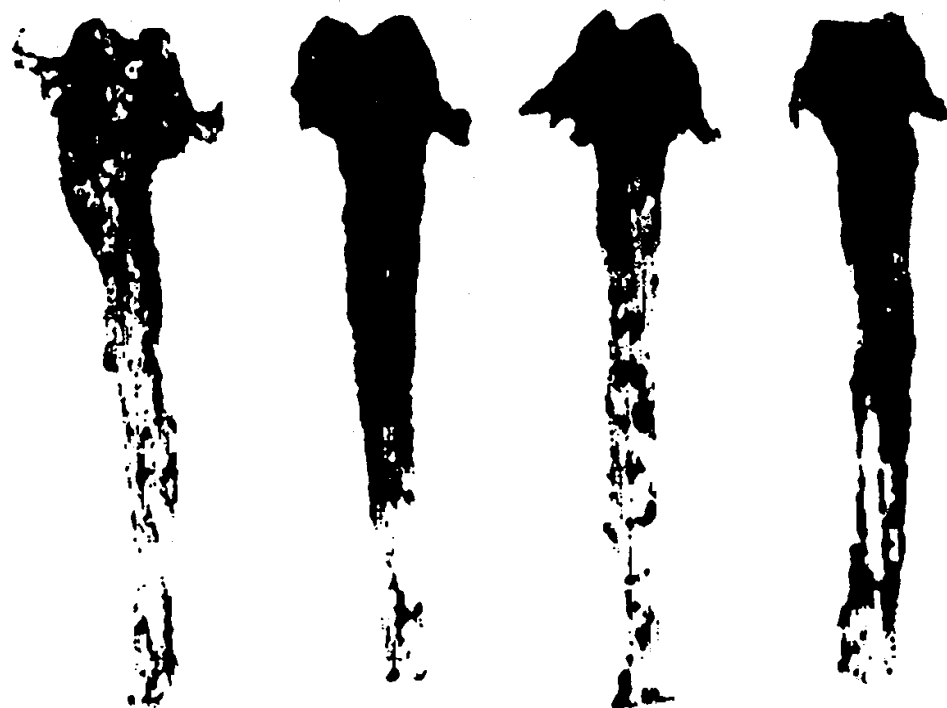


图 1

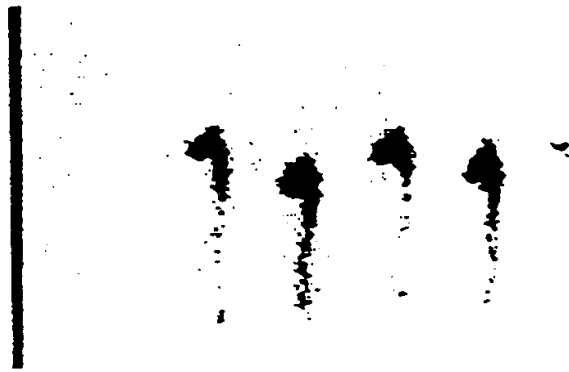


图 2

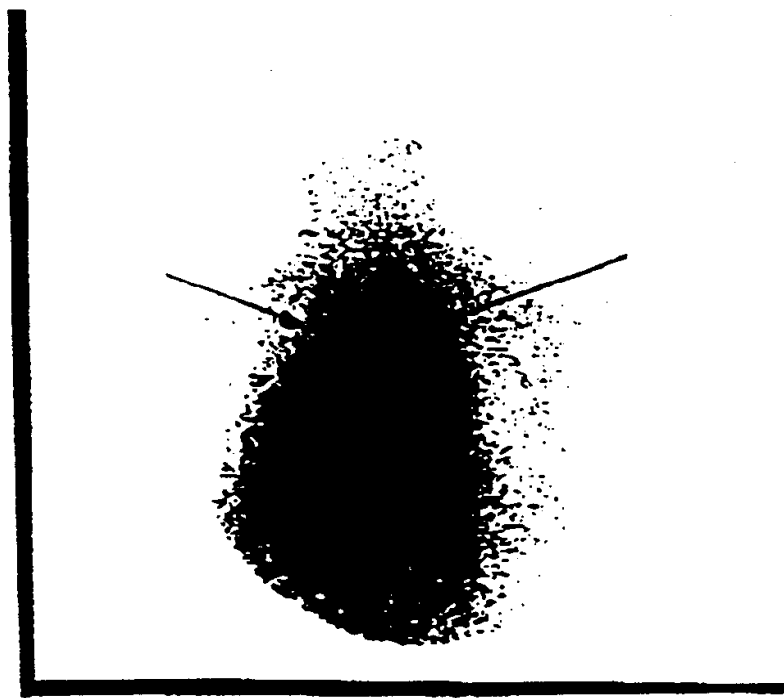


图 3

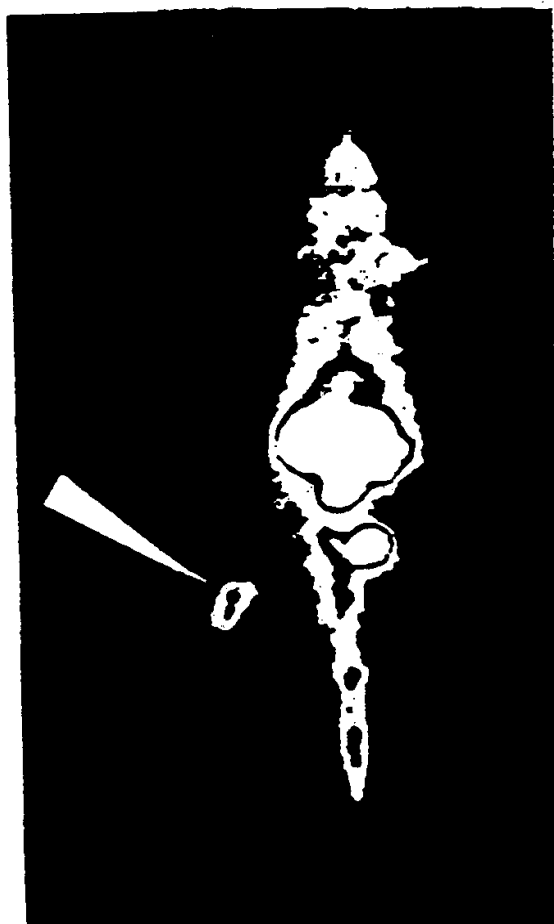


图 4